

Aus der Klinik für Hals–, Nasen–, Ohrenheilkunde, Kopf– und Halschirurgie

(Direktorin: Prof. Dr. Ambrosch)

im Universitätsklinikum Schleswig–Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Lysyloxidase-4 Expression in Pankreaskarzinomen:
Immunhistochemische Analyse mittels eines anti-LOXL4
monoklonalen Antikörpers**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Marian Kiel

aus Mainz

Kiel 2017

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Tibor Görögh

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med Felix Treumer

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.07.2018

gez.: [Prof. Dr. Johann Roider]

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 LOXL4.....	1
1.2 Pankreaskarzinom.....	3
1.2.1 Epidemiologie.....	4
1.2.2 Ätiologie.....	5
1.2.3 Klinik.....	6
2 Zielsetzung.....	8
3 Material und Methoden.....	9
3.1 Material.....	9
3.2 Methoden.....	11
3.2.1 Immunhistochemische Färbung von LOXL4.....	11
3.2.2 Negativkontrolle mit benignen Gewebeproben aus der Mundschleimhaut.....	13
3.2.3 Einteilung der Expressionsstärke von LOXL4.....	13
3.2.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	14
4 Ergebnisse.....	15
4.1 Verteilung der LOXL4-Expressionen in Pankreaskarzinomen.....	15
4.2 LOXL4-Expression im Verhältnis zur Tumorgroße.....	17
4.3 LOXL4-Expression im Verhältnis zum Nodalstatus.....	19
4.4 LOXL4-Expression im Verhältnis zum Auftreten von Fernmetastasen.....	21
4.5 LOXL4-Expression im Verhältnis zum Grading.....	23
4.6 LOXL4-Expression im Verhältnis zum Staging.....	24
4.7 Gesamtüberleben des Patientenkollektivs.....	24
4.8 Gesamtüberleben des Patientenkollektivs im Verhältnis zur Tumorgroße.....	25
4.9 Gesamtüberleben des Patientenkollektivs im Verhältnis zur LOXL4-Expressionsstärke.....	27
5 Diskussion.....	29
6 Zusammenfassung.....	35
Literaturverzeichnis.....	37
Danksagung.....	44
Lebenslauf.....	45

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunhistologischer Nachweis von LOXL4 in Pankreaskarzinomen mit fehlender (A), schwacher (B), mittlerer (C) und starker Expression (D). Die benigne Mundschleimhautbiopsie (E) weist keine LOXL4-Reaktivität auf. (Vergrößerung x200).....	16
Abbildung 2: LOXL4-Expression im Verhältnis zur Tumorgroße	17
Abbildung 3: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Nodalstatus.....	20
Abbildung 4: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Auftreten von Fernmetastasen	22
Abbildung 5: Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve des gesamten Patientenkollektivs	25
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve des Patientenkollektivs im Verhältnis zur Tumorgroße	26
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve des Patientenkollektivs im Verhältnis zur hohen und geringen LOXL4-Expression.....	27

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation von Pankreaskarzinomen (nach UICC von 2002) (Hiddemann et al. 2004)	9
Tabelle 2: Stadiengruppierung von Pankreaskarzinomen (nach UICC von 2002)	10
Tabelle 3: Verteilung der Patienten mit Pankreaskarzinomen nach TNM-Klassifikation (nach UICC von 2002) (Hiddemann et al. 2004).....	10
Tabelle 4: Histopathologisches Grading nach WHO / TNM.....	11
Tabelle 5: Einteilung der LOXL4-Expressionslevel in Untergruppen	14
Tabelle 6: Verteilung der LOXL4-Expressionen in Pankreaskarzinomen.....	15
Tabelle 7: LOXL4-Expression im Verhältnis zur Tumorgroße	17
Tabelle 8: LOXL4 als diagnostischer Marker zur Differenzierung zwischen Low-Grade- und High-Grade-Tumoren.....	18
Tabelle 9: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Nodalstatus.....	19
Tabelle 10: LOXL4 als diagnostischer Marker zur Differenzierung zwischen positivem und negativem Nodalstatus.....	20
Tabelle 11: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Auftreten von Fernmetastasen.....	21
Tabelle 12: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Auftreten von Fernmetastasen	22
Tabelle 13: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Grading	23
Tabelle 14: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Staging.....	24
Tabelle 15: Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve des Patientenkollektivs	24
Tabelle 16: Gesamtüberleben des Patientenkollektivs in Abhängigkeit zur Tumorgroße	26
Tabelle 17: Gesamtüberleben des Patientenkollektivs im Verhältnis zur LOXL4- Expressionsstärke	28

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivator-Protein-1
CA 19-9	<i>Carbohydrate antigen 19-9</i>
CP1	<i>Coat protein 1</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAMMM-Syndrom	Familiäres atypisches multiple Muttermal- und Melanom-Syndrom
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
Kb	Kilobasen
LOX	Lysyloxidase
LOXL1	<i>Lysyl oxidase-like 1</i>
LOXL2	<i>Lysyl oxidase-like 2</i>
LOXL4	<i>Lysyl oxidase-like 4</i>
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RFX1	<i>Regulatory Factor X1</i>
P-Wert	Signifikanzwert
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
SRCR	<i>Scavenger receptor cysteine-rich domain</i>
TBP	TATA-Bindeprotein
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TPA	Tetradecanoylphorbolacetat
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UTR	Untranslatierte Region

1. Einleitung

1.1 LOXL4

Das Bindegewebe des Menschen besteht aus zwei Teilen, dem zellulären und dem extrazellulären. Die Extrazellulärmatrix wird durch Fasern aus Kollagen und Elastin sowie durch Glycosaminoglycane und Proteoglycane gebildet (Rassow 2008). In der Fibrillogenese des Kollagens spielt dabei das Enzym Lysyloxidase (LOX) eine wichtige Rolle in der Quervernetzung (Crosslinks) der Tropokollagene in Kollagenfibrillen, aus denen in einem späteren Schritt durch Zusammenlagerung Kollagenfasern werden (Rassow 2008). Die Lysyloxidase spielt analog eine ähnlich wichtige Rolle in der Quervernetzung des Elastins, welches dann im Zusammenspiel mit Mikrofibrillen elastische Fasern ergibt, welche essentiell für die Funktion der Extrazellulärmatrix sind (Rassow 2008).

Lysyloxidasen sind Teil einer Gruppe von Enzymen, die nicht nur die Entstehung von Crosslinks in Kollagen und Elastin katalysieren (Kagan et al. 1991), sondern auch weitere Funktionen wahrnehmen: Es tritt dabei nicht nur intrazellulär, sondern auch intranukleär auf (Csiszar 2001) und vermittelt in der Tumorentstehung und Tumorprogression wichtige Vorgänge. Zu diesen gehören erhöhtes Zellwachstum und erhöhte Zellmigration (Csiszar 2001) sowie geringere Adhäsion und Zellvermehrung trotz widriger Umstände, wie zum Beispiel einer geringen Nährstoffversorgung (Giampuzzi et al. 2001). Bei Untersuchungen an Magenkarzinomzellen wurde festgestellt, dass die LOX-Familie unter anderem die Invasion in umliegendes Gewebe katalysiert (Li et al. 2015), wobei einzelne Untergruppen der LOX-Familie jeweils verschiedene Vorgänge auszuführen scheinen (Csiszar 2001). All diese Ergebnisse machen eine genauere Betrachtung der LOX-Familie im Kontext der Entwicklung des Pankreaskarzinoms interessant.

Der Aufbau von Lysyloxidasen sieht wie folgt aus: An der C-Terminalen Region befinden sich die Kupferbindungsdomäne und der für die enzymatische Aktivität

wichtige Lysyl-Tyrosyl-Quinon-Rest. Die N-Terminale Region legt die genaue Funktion jeder der bisher vier LOX-Untergruppen fest (Li et al. 2015). Sie haben ein für die enzymatische Funktion essentielles Signalpeptid (Kagan et al. 1995) und einen Kupferanteil gemeinsam; die Untergruppen Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) bis LOXL4 haben vier Scavenger receptor cysteine-rich domains (SRCR) (Trackman 2016), die an Liganden binden können (Yap et al. 2015).

Die besondere Rolle von LOX in der Tumorgenese wurde zuerst 2002 durch Untersuchungen an Mammakarzinomen (Kirschmann et al. 2002) deutlich: Kirschmann und Mitarbeiter kamen in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass die LOX-Expressionen nur bei hoch-invasiven Mammakarzinomen erhöht waren, während dies bei gering-invasiven Mammakarzinomen nicht der Fall war. 2003 wurde eine Überexpression des speziell für LOXL4 codierenden Gens bei Kopf-Hals-Karzinomen von Holtmeier und Mitarbeitern gezeigt (Holtmeier et al. 2003). Weiterhin korrelierte die Expression von LOXL4-mRNA mit einer gesteigerten Tumorgröße und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen bei Kopf-Hals-Karzinomen (Görögh et al. 2007).

Das Gen, das für LOXL4 codiert, befindet sich auf dem Chromosom 10q24 (Asuncion et al. 2001), das Produkt ist ein 84,5 Kilodalton (kDa) schweres extrazelluläres Protein (Mäki et al. 2001). Die dazu gehörige mRNA ist 3,5 Kilobasen (kb) lang und liegt in verschiedenen Konzentrationen in mehreren Geweben, unter anderem dem Pankreas, vor (Asuncion et al. 2001). Nach Untersuchungen von Görögh und Mitarbeitern ist das LOXL4-Gen wie folgt organisiert: Zwischen der Transkriptions-Initiationsstelle und dem Exon-1 liegt eine zur 5' untranslatierten Region (UTR) gehörende Leader-Sequenz mit einer Länge von 384bp. Die Länge der 3' UTR beträgt ca. 1230bp. In diesem Bereich liegen mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie das Tetradecanoylphorbolacetat (TPA)-responsive Element (TGACTCA) bei -75 für die Bindung des Aktivator-Protein-1 (AP-1)-Transkriptionsfaktors, die GATA-Domäne bei -113, -506 und -669, die Regulatory Factor X1 (RFX1)-Transaktivator-Bindungsstelle (GGAA) bei -149, die

Bindungsstelle für den Specificity protein 1 (Sp1)-Transkriptionsfaktor (GGCGGC) bei -181, der Coat protein 1 (CP1)-Faktor (CCAAT) bei -257 und -892 sowie das Sequenzmotiv GAAA bei -310 und -329, die ebenfalls zu den konservierten Erkennungssequenzen für DNA-Bindungsproteine gehören. Ferner enthält die UTR repetitive Sequenzmotive in unterschiedlichen Positionen von der Transkriptions-Startseite, von denen einige Tetraloops darstellen. Consensus-Sequenzen, typisch für die GC-Box, sind nicht präsent. An der Regulation der LOXL4-Genexpression sind primär die Transkriptionsfaktoren TATA-Bindeprotein-Transkriptionsfaktor (TBP) und Sp1 beteiligt (Görögh et al. 2008).

Bisher sind noch keine Untersuchungen zur diagnostischen und prognostischen Aussagekraft der LOXL4- Expression bei Pankreaskarzinomen durchgeführt worden. Von der Arbeitsgruppe Görögh und Weise wurden in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) Campus Kiel polyklonale und monoklonale Anti-LOXL4-Antikörper entwickelt. Da diese für die Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen aufgrund ihrer Sensitivität und Spezifität geeignet sind, boten sie sich an, für die Untersuchungen von Pankreaskarzinomen eingesetzt zu werden.

1.2 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom stellt die Medizin unverändert vor große Herausforderungen. Sowohl Inzidenz als auch Mortalität haben sich in Deutschland in den letzten 20 Jahren, großem Forschungsaufwand zum Trotz, kaum geändert; das Pankreaskarzinom ist nach wie vor das Karzinom mit den geringsten Überlebensraten überhaupt (Robert-Koch-Institut 2012). Die in den letzten Jahren kaum vorhandene Verbesserung der Prognose des Pankreaskarzinoms liegt unter anderem an der in Bezug auf den Erkrankungsbeginn oft spät erfolgenden Diagnosestellung (Leitlinienprogramm

Onkologie 2013). Dieses schwere Krankheitsbild ist daher ein wichtiges Einsatzgebiet für neue Werkzeuge, die die Diagnostik und damit den früher einsetzenden Behandlungsbeginn des Pankreaskarzinoms positiv beeinflussen können. Eine Möglichkeit hierzu stellt das tumorassoziierte Lysyl oxidase-like 4 (LOXL4)-Antigen dar, sofern dieses eine diagnostische und prognostische Aussage zum Pankreaskarzinom erlaubt.

Die Eignung des tumorassoziierten LOXL4-Antigens für diese Aufgabe soll in dieser Doktorarbeit genauer behandelt werden. Zum besseren Verständnis wird zunächst das Pankreaskarzinom vorgestellt.

1.2.1 Epidemiologie

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) nimmt zwei Funktionen wahr: Eine exokrine, die in der Produktion von Verdauungssäften liegt, sowie eine endokrine, die die Produktion von Hormonen beinhaltet (Robert-Koch-Institut 2012). Die überwiegende Mehrheit der Pankreaskarzinome entwickelt sich aus den exokrinen Zellen des Pankreas und wird als Adenokarzinom klassifiziert. Auf diesen letzteren Entwicklungsweg sind ungefähr 95% aller Pankreaskarzinome zurückzuführen, während der Anteil an Pankreaskarzinomen, die aus dem endokrinen Teil erwachsen, gering ist (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Dem Pankreaskarzinom kommt durch seine aggressive Natur und schlechte Prognose eine besondere Bedeutung zu. Bei Männern durchschnittlich im Alter von 70 Jahren und bei Frauen im Alter von 76 Jahren diagnostiziert (Leitlinienprogramm Onkologie 2013), liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei ungefähr 7% (Robert-Koch-Institut 2012). Die mittlere Überlebenszeit liegt bei Patienten, denen keine Therapie zukommt, bei drei Monaten (Warszawskiet al. 1999). Meist werden Pankreaskarzinome nicht diagnostiziert, bevor sie sich bereits in einem fortgeschrittenen Stadium befinden und in ihre Umgebung gestreut haben (Hingorani et al. 2003). Dies sowie die üblicherweise geringen verbleibenden

kurativen Möglichkeiten tragen entscheidend zu der seit 20 Jahren unverändert schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms bei (Robert-Koch-Institut 2012).

1.2.2 Ätiologie

Die Ursachen für die Entstehung des Pankreaskarzinoms sind vielfältig, es sticht jedoch besonders das Rauchen als disponierender Faktor heraus: Während bei 20% aller Pankreaskarzinome das Rauchen als wahrscheinliche Ursache ermittelt werden konnte, erhöht das Rauchen an sich die Wahrscheinlichkeit, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, um 75%. Besonders die Exposition gegenüber Nitrosaminen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen scheint hier eine Rolle zu spielen (Munding et al. 2012).

Der Einfluss der Ernährung auf die Entstehung des Pankreaskarzinoms ist weniger detailliert beschrieben als die des Rauchens, besteht jedoch trotzdem. So gilt geräucherte und gegrillte Nahrung als risikoerhöhend, ebenso der exzessive Genuss von Alkohol (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Auch zu einem langfristig bestehendem Diabetes Mellitus und dem Auftreten eines Pankreaskarzinoms konnte ein Zusammenhang festgestellt werden (Everhart 1995). Bei der Pankreatitis führt die andauernde entzündungsbedingte Reizung von pankreatischen Azinuszellen zur Metaplasie und anschließend zur malignen Entartung (Pinho et al. 2014).

Weiterhin gibt es genetische Faktoren, die stark für eine Erkrankung disponieren: Mit einem Peutz-Jeghers-Syndrom geht beispielsweise die Erhöhung des Risikos, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, mit den Faktor 135 einher und bei einer Veranlagung zum familiären atypischen multiplen Muttermal- und Melanom (FAMMM)-Syndrom um den Faktor 9-47. Der Großteil der disponierenden Gene ist jedoch nach wie vor nicht bekannt (Kamisawa et al. 2016).

Insgesamt ist die Genese von Pankreaskarzinomen als multifaktoriell einzustufen (Lin et al. 1981).

1.2.3 Klinik

Das Pankreaskarzinom präsentiert sich nach Beginn der Erkrankung in der Regel erst spät durch charakteristische Symptome; insbesondere in der Frühphase können Anzeichen dieser Erkrankung schwach ausgeprägt sein oder völlig fehlen. Das Pankreaskarzinom frühzeitig zu erkennen, stellt insofern nach wie vor eine große Herausforderung dar. Grundsätzlich eines Pankreaskarzinoms verdächtig sind neu aufgetretene Oberbauch- oder Rückenschmerzen, welche wegweisend für eine Pankreaskarzinom-Diagnostik sein können. Andere frühe Symptome sind Übelkeit, Erbrechen, Gewichtsverlust und Steatorrhoe (Böhmig et al. 2001). Die unspezifischen Symptome des Pankreaskarzinoms können in Intervallen auftreten und machen es sowohl dem Patienten als auch dem Arzt schwer, das sich entwickelnde Pankreaskarzinom zu erkennen. Gerade die symptomfreien Abstände zwischen den Intervallen mit Beschwerden vermitteln dem Patienten das Gefühl, gesund zu sein und an keiner ernsthaften Erkrankung zu leiden (Evans et al. 2014).

Ein wenig spezifischer ist in dieser Hinsicht das Auftreten eines Verschlussikterus, welcher durch das Wachstum eines Pankreaskarzinoms ausgelöst werden kann (Freelove et al. 2006). Dieser deutet allerdings, genauso wie die Hämatochezie oder ein pulsierender Tumor unter den Rippen, auf ein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium hin (Evans et al. 2014).

Die Diagnostik des Pankreaskarzinoms erfüllt mehrere Aufgaben, zum einen natürlich die frühzeitige Tumordetektion, aber auch die Beurteilung der Dignität, der Entität und des Stagings zur Therapieplanung (Böhmig et al. 2001). Hierfür bieten sich mehrere Möglichkeiten an, so zum Beispiel die Oberbauchsonographie, die Endosonographie, das CT und das MRT in Kombination mit einer Magnetresonananz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) (Leitlinienprogramm

Onkologie 2013). Der Goldstandard ist hierbei das CT, da es eine hohe Sensibilität bietet und Rückschlüsse auf die Resektabilität des Tumors zulässt (Freelove et al. 2006).

Wurde eine Raumforderung des Pankreas festgestellt, kann zur Diagnosesicherung zunächst einmal eine Carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9)-Untersuchung im Serum erfolgen, welche eine hohe Sensitivität für das Auftreten eines Pankreaskarzinoms bietet (Böhmg et al. 2001). Biopsien einer pankreaskarzinomsuspekten Läsion kommen eher bei Planung einer palliativen Therapie in Frage und die Indikation hierzu wird aufgrund der möglichen Komplikationen, wie zum Beispiel Stichkanalmetastasen, nicht jedes Mal gestellt (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Die Auswahl der durchzuführenden Behandlung orientiert sich an den diagnostisch erhobenen Befunden, insbesondere dem Staging (Zhang et al. 2016), wobei bei einer pankreaskarzinomverdächtigen Läsion primär die Resektion empfohlen wird (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Die Resektion stellt derzeit den einzigen kurativen Ansatz in der Therapie des Pankreaskarzinoms dar, auch wenn Operationen mit palliativer Intention stattfinden (Vincent et al. 2011). Einer geplanten Operation kann hierbei eine explorative Laparotomie vorausgehen (Bakens et al. 2015). Der Anteil an Patienten, für die eine kurative Resektion in Frage kommt, ist aufgrund der frühen Metastasierung gering (Clancy 2015) und die mittlere Lebenserwartung nach Resektion, selbst mit neoadjuvanter Chemotherapie, beträgt lediglich 20-23 Monate. Gründe dafür sind nach der Operation häufig auftretende Komplikationen, wie zum Beispiel Fisteln, Abszesse und Infektionen; auch Tumorrezidive sind vielfach zu beobachten (Ansari et al. 2015).

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, in welchem Maße LOXL4 in Pankreaskarzinomen gebildet wird und ob sein Expressionsmuster eine diagnostische und prognostische Wertigkeit hat. Zu diesem Zweck wurden 103 tiefgefrorene Tumorproben von Patienten mit histopathologisch gesicherten Pankreaskarzinomen immunhistochemisch mit einem monoklonalen LOXL4-Antikörper angefärbt. Die LOXL4-Expression wurde daraufhin sowohl dem TNM-Stadium als auch dem Grading, dem Staging und der Überlebenszeit des Patienten gegenübergestellt. Diese Untersuchungen erfolgten einmal in Hinblick auf die positive/negative und schwache/starke LOXL4-Expression. Um jeweils eine schwache und starke LOXL4-Expression festlegen zu können, wurden die vier Expressionsstufen des LOXL4 im Tumorgewebe in zwei Übergruppen zusammengefasst. Die eine Übergruppe fasst die beiden niedrigen Expressionsgrade null und eins (-/+) zusammen, während die andere Übergruppe die beiden hohen Expressionsgrade zwei und drei (++) beinhaltet. Dies hatte unter anderem eine bessere statistische Auswertbarkeit zur Folge. Um einen Hinweis auf eine mögliche prognostische Relevanz des LOXL4-Markers feststellen zu können, wurde anhand der klinischen Daten die Überlebenszeit ermittelt und diese mit den Expressionsdaten von LOXL4 statistisch analysiert. Dabei wurden nur Patienten in die Studie mit einbezogen, die am UKSH Campus Kiel behandelt worden waren.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Für diese Doktorarbeit lagen histologisch gesicherte Gewebeproben (n=103) von Pankreaskarzinomen vor, die zwischen 1999 und 2013 am UKSH Campus Kiel reseziert worden waren. Die Zielsetzung dieser Operationen war sowohl kurativ als auch palliativ. Es handelte sich dabei um 57 (55.3%) Männer und 46 (44.7%) Frauen. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 65 Jahre; der jüngste Patient war dabei 35 Jahre alt und der älteste 85 Jahre. Das follow-up wurde definiert als Wiedervorstellung im UKSH Campus Kiel oder Versterben. Die maximale follow-up-Dauer betrug 102 Monate; die geringste drei Tage; der Mittelwert lag bei 16,65 Monaten. Die TNM-Klassifikation und das Staging der Pankreaskarzinome wurden nach den Union internationale contre le cancer (UICC)-Stadien von 2002 vorgenommen, welche in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt sind.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation von Pankreaskarzinomen (nach UICC von 2002) (Hiddemann et al. 2004)

TNM-Status	Einteilung
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf Pankreas begrenzt, ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor auf Pankreas begrenzt, > 2 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumorausdehnung über das Pankreas hinaus, jedoch ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder Arteria mesenterica superior
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN0	Regionäre Lymphadenektomie und histologische Untersuchung üblicherweise von 10 oder mehr Lymphknoten
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2: Stadiengruppierung von Pankreaskarzinomen (nach UICC von 2002)

Stadium	TNM-Klassifikation		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1-3	N1	M0
Stadium III	T4	Jedes N	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Der Anteil der Patienten mit einer großen Tumorausdehnung (T3 und T4) lag bei insgesamt 80,6%. Bei 67,9% der Patienten bestand ein positiver Lymphknotenstatus. Patienten, bei denen keine Fernmetastasen festgestellt worden waren, machten 79,6% des Kollektivs aus. Diese Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Verteilung der Patienten mit Pankreaskarzinomen nach TNM-Klassifikation (nach UICC von 2002) (Hiddemann et al. 2004)

Klassifizierung	Anzahl [n]	Prozentualer Anteil
TX	8	7,8%
T1	1	1,0%
T2	11	10,7%
T3	76	73,8%
T4	7	6,8%
NX	7	6,8%
N0	26	25,2%
N1	70	67,9%
MX	9	8,7%
M0	82	79,6%
M1	12	11,7%

Die Einteilung und Klassifizierung der untersuchten Pankreaskarzinome sind in Tabelle 4 aufgeführt. Bei sechs Patienten lagen keine Daten zum Grading vor.

Tabelle 4: Histopathologisches Grading nach WHO / TNM

Klassifizierung	Einteilung	Anzahl [n]
GX	Nicht bestimmbar	6
G1	Gut differenziert	9
G2	Mäßig differenziert	53
G3	Schlecht differenziert	34
G4	Undifferenziert	1

Die zur statistischen Auswertung erforderlichen Patientendaten wurden aus der Datenbank „ProWebDB“ des UKSH Campus Kiel übernommen. Alle Patienten, deren Tumorsektate im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, hatten zuvor schriftlich ihr Einverständnis erklärt. Zusätzlich liegt ein positives Votum der Ethikkommission des UKSH Campus Kiel vor (Aktenzeichen: A 110/99).

3.2. Methoden

3.2.1. Immunhistochemische Färbung von LOXL4

Bei den vorliegenden Präparaten handelte es sich um Gefrierschnitte, die bei -20°C aufbewahrt und am Mikrotom (Reichert-Jung, Nußloch) auf eine Dicke von 4-5 µm geschnitten wurden. Anschließend wurden sie auf Objektträger (Superfrost, Menzel) gebracht. Zur Durchführung der Immunhistochemie wurden die Präparate zuerst 10 Minuten lang in eiskaltem Aceton fixiert. Nach einer Trocknung durch 0,3% wasserstoffsuperoxidhaltiges Methanol wurde die endogene Peroxidase blockiert. Anschließend erfolgte ein fünfminütiges Waschen in 0,05M Tris-HCl

0,15M NaCl-Puffer (TBS). Nach dem Waschen wurde durch das Auftragen einer Lösung, bestehend aus fötalem Kälberserum und phosphatgepufferter Salzlösung (FCS/PBS) (60µl FCS in 2ml PBS [0,15 NaCl, 2,5mM KCl, 15mM NaH₂PO₄, 15mM Na₂HPO₄, pH 7,4]), eine weitere enzymatische Reaktion blockiert.

Im Anschluss wurden 100µl 1:400 verdünnter monoklonaler Maus-Anti-LOXL4-Antikörper (Eigenherstellung PD Dr. Tibor Görögh, HNO-Klinik UKSH Campus Kiel) für 24 Stunden aufgetragen. Die für die immunhistochemische Untersuchung verwendete Menge und Sensitivität des primären LOXL4 Antikörpers richtete sich nach den Untersuchungen von Görögh und Mitarbeitern sowie Weise und Mitarbeitern. Sie zeigten an Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes, dass der LOXL4-Antikörper bei Verwendung von Antikörpermengen zwischen 0,2µg/ml und 1µg/ml eine optimale Färbereaktion liefert (Görögh et al. 2007; Weise et al. 2008).

Nach einem weiteren fünfminütigen TBS-Waschgang wurde der sekundäre biotinmarkierte anti-Maus Antikörper (DAKO, Hamburg) bei einer Verdünnung von 1:300 aufgetragen und für 30 Minuten auf dem Präparat belassen.

Die Spezifität des LOXL4-Antikörpers wurde mittels Sodium dodecyl sulfate (SDS)-Gelelektrophorese und Western-Blot überprüft und es wurde keine Kreuzreaktion mit anderen Proteinspecies nachgewiesen (Görögh et al. 2007, Weise et al. 2008). Auch der Biotin-konjugierte anti-Maus-IgG-Antikörper wies nach Angaben der Herstellfirma keine Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen auf.

Nach Ablauf der 30 Minuten wurde ein weiteres Mal mit TBS gewaschen und danach zur Bindung des biotinylierten sekundären Antikörpers der Avidin-Biotin (AB)-Komplex (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 30 Minuten aufgetragen. Nach einem weiteren TBS-Waschgang wurde das Präparat mit einem 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Farbsubstrat (Vector Novared Substratkit; Biologo, Kiel) über eine Dauer von 20 Minuten gefärbt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Färbung durch Eintauchen der Präparate in eine TBS-Lösung gestoppt.

Anschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämalun vorgenommen. Diese wirkte für 30 Sekunden ein. Nach Abschluss der Gegenfärbung wurden die Präparate für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert, dann anschließend in einer Ethanolreihe in aufsteigender Konzentration (70%, 80%, 96%) behandelt. Abschließend wurden die Präparate für 2×10 Minuten in Xylol (DiaTec, Bamberg) inkubiert und in Eukit (Kindler, Freiburg) eingebettet. Die Bewertung fand an einem Lichtmikroskop (Zeiss Axioplan, Hamburg) statt.

Die mikroskopische Betrachtung und Auswertung der Präparate erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher, denen zum Zeitpunkt der Auswertung keine der klinisch-pathologischen Befunde bekannt waren.

3.2.2. Negativkontrolle mit benignen Gewebeproben aus der Mundschleimhaut

Als Negativkontrolle wurden zehn Gewebeproben aus der Mundschleimhaut nach genau dem gleichen immunhistochemischen Schema wie die Proben der Pankreaskarzinome behandelt und ausgewertet. Die zehn Gewebeproben wurden gesunden Probanden unter einer klinischen Fragestellung im Rahmen operativer Eingriffe entnommen. Eine Probenentnahme eigens zur Verwendung in dieser Arbeit fand nicht statt.

3.2.3. Einteilung der Expressionsstärke von LOXL4

Bei der Auswertung der einzelnen histologischen Präparate wurde bei 200-facher Vergrößerung der Anteil der positiv gefärbten Zellen in fünf Zählfeldern festgestellt, pro Präparat insgesamt 300 Zellen. Anschließend wurden die Präparate in vier verschiedene Kategorien eingeteilt, je nach Anteil der positiv gefärbten Zellen. Diese Kategorien waren wie in Tabelle 5 dargestellt eingeteilt:

Tabelle 5: Einteilung der LOXL4-Expressionslevel in Untergruppen

	Kategorie	Anteil der positiv gefärbten Tumorzellen
1	-	Weniger als 5%
2	+	5% bis 30%
3	++	31% bis 75%
4	+++	Mehr als 75%

In der statistischen Auswertung wurden einerseits die Kategorien eins und zwei (keine sowie geringe Ausprägung) zusammengefasst den Kategorien drei und vier (hohe sowie sehr hohe Ausprägung) gegenübergestellt. Andererseits wurde die Kategorie eins (keine Ausprägung) den Kategorien zwei, drei und vier (geringe, moderate sowie hohe Ausprägung) gegenübergestellt

3.2.4. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Darstellung der für die Auswertung relevanten Parameter LOXL4-Ausprägung, TNM-Status, Grading und Staging erfolgte sowohl prozentual als auch absolut. Sie wurden alle ordinal skaliert. Die statistische Auswertung an sich erfolgte in Kreuztabellen mit IBM SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc. an IBM Company, Chicago, IL). In diesen Kreuztabellen wurde jeweils die LOXL4-Expression einem anderen Parameter, zum Beispiel der Tumorgroße, gegenübergestellt. Für jede Gegenüberstellung wurde ein exakter Chi-Quadrat-Test (Zusammenhang linear-mit-linear) durchgeführt. Um die Eignung des LOXL4-Markers als Diagnostikum zu beurteilen, wurde jeweils in Bezug auf die Tumorgroße und den Nodalstatus eine Berechnung der Sensitivität, der Spezifität, des positiven und des negativen prädikativen Wertes durchgeführt. Um zu entscheiden, ob der Marker besser für eine Unterscheidung zwischen hoher und niedriger beziehungsweise positiver und negativer Tumorgroße/Nodalstatus geeignet ist, wurde eine Berechnung des Youden-Indexes durchgeführt. Um den Einfluss der LOXL4-Expression auf das

Gesamtüberleben der Patienten festzustellen, wurde eine Analyse nach Kaplan-Meyer durchgeführt; der Log-Rank-Test wurde hierbei zum Feststellen von Abhängigkeiten zwischen dem Überleben der Patienten und der LOXL4-Expressionsstärke genutzt. P-Werte von ≤ 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen und die Ergebnisse entsprechend berücksichtigt.

4. Ergebnisse

4.1. Verteilung der LOXL4-Expressionen in Pankreaskarzinomen

Im Verlauf dieser Untersuchung wurden insgesamt 103 tiefgefrorene Gewebebiopsien von Pankreaskarzinomen und 10 benigne Mundschleimhautbiopsien als Negativkontrollen immunhistochemisch auf das Vorhandensein von LOXL4-Expressionen geprüft. Die in Tabelle 6 aufgeführten Werte zeigen, dass insgesamt zwölf Proben (11,7%) keine LOXL4-Expression aufwiesen; bei insgesamt 24 Proben (23,3%) wurde eine schwache, bei 32 Proben (31,7%) eine moderate und bei 35 Proben (34%) eine starke LOXL4-Expression festgestellt. Abbildung 1 stellt repräsentative immunhistochemische Schnitte dar mit unterschiedlich starker LOXL4-Expression.

Tabelle 6: Verteilung der LOXL4-Expressionen in Pankreaskarzinomen

Expressionsstärke		LOXL4 [n]
Niedrig <30%	-	12 (11,7%)
	+	24 (23,3%)
Hoch $\geq 30\%$	++	32 (31,7%)
	+++	35 (34%)
Total		103 (100%)

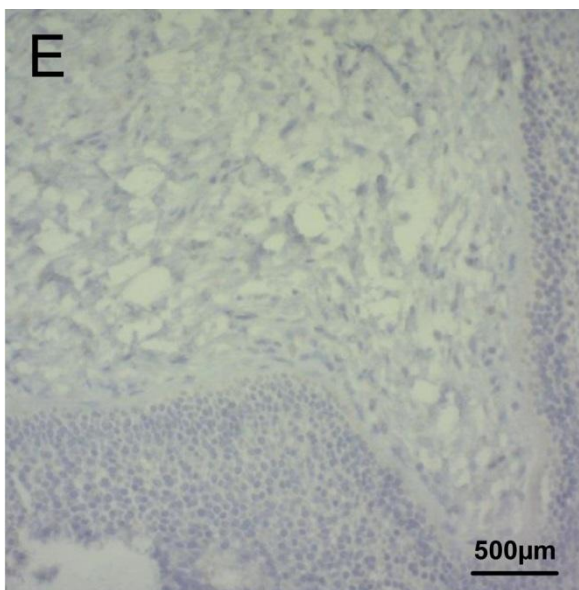
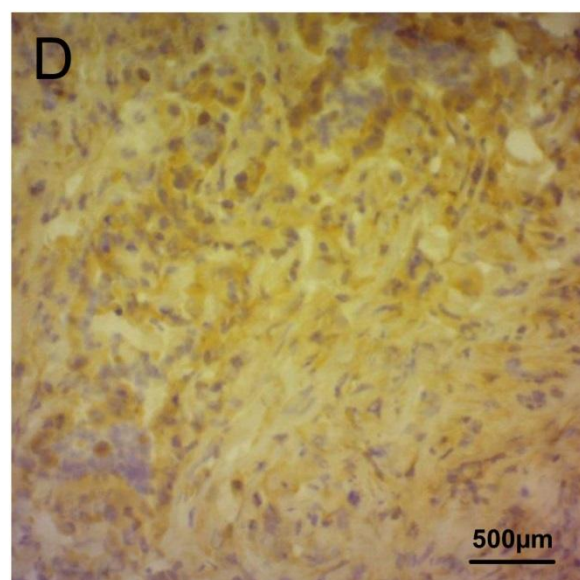
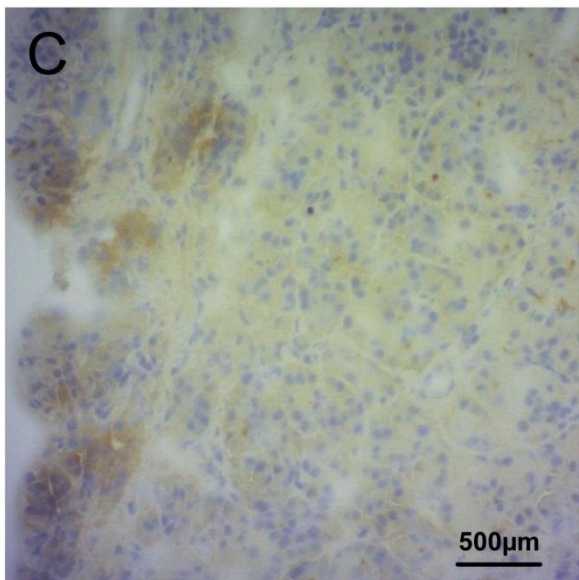
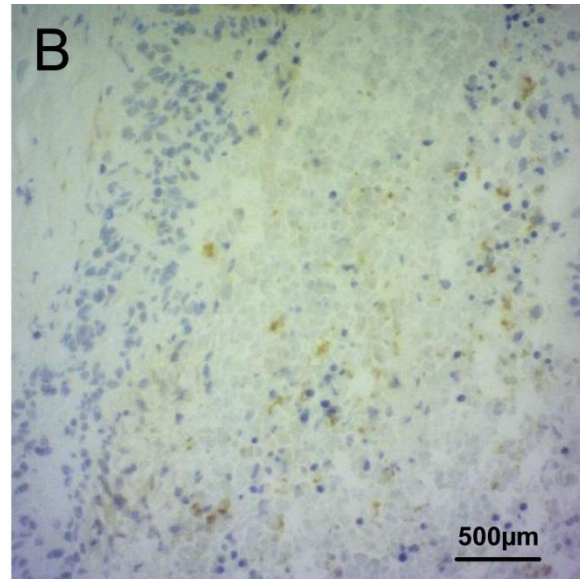
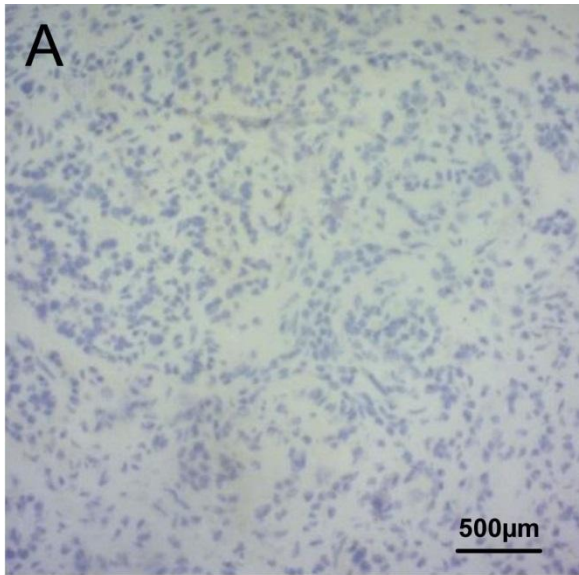


Abbildung 1: Immunhistologischer Nachweis von LOXLA in Pankreaskarzinomen mit fehlender (A), schwacher (B), mittlerer (C) und starker Expression (D). Die benigne Mundschleimhautbiopsie (E) weist keine LOXLA-Reaktivität auf. (Vergrößerung $\times 200$)

4.2. LOXL4-Expression im Verhältnis zur Tumorgröße

Die Datenlage ließ eine Auswertung von 95 Proben zu. In Tabelle 7 sind die LOXL4-Expression und die Tumorgröße der Proben dargestellt. Die Grafik in Abbildung 2 zeigt, wie mit zunehmender Tumorgröße der Anteil an höheren LOXL4-Expressionen steigt.

Tabelle 7: LOXL4-Expression im Verhältnis zur Tumorgröße

LOXL4-Expression		Tumorgröße				Gesamt [n]
		T1 [n]	T2 [n]	T3 [n]	T4 [n]	
Niedrig <30%	-	0 (0%)	2 (18,2%)	8 (10,5%)	0 (0%)	10 (10,5%)
	+	1 (100%)	5 (45,5%)	14 (18,4%)	1 (14,3%)	21 (22,1%)
Hoch ≥30%	++	0 (0%)	2 (18,2%)	28 (36,8%)	1 (14,3%)	31 (32,6%)
	+++	0 (0%)	2 (18,2%)	26 (34,2%)	5 (71,4%)	33 (34,7%)
Gesamt		1 (100%)	11 (100%)	76 (100%)	7 (100%)	95 (100%)

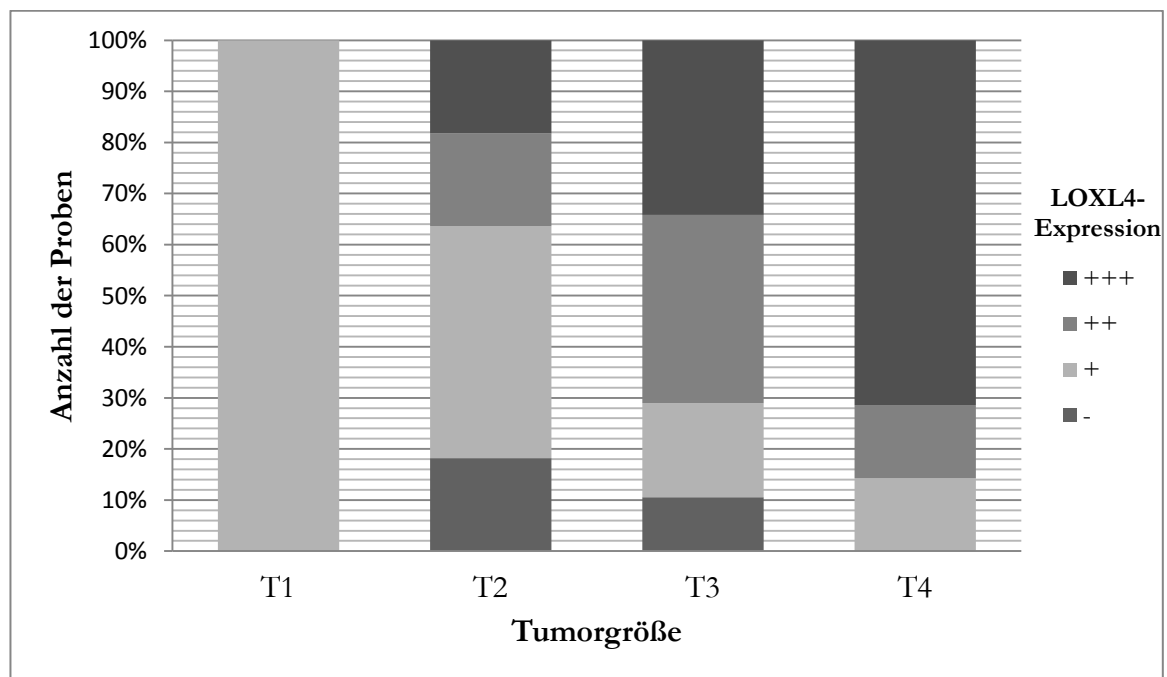


Abbildung 2: LOXL4-Expression im Verhältnis zur Tumorgröße

Um zu prüfen, ob eine Korrelation tatsächlich besteht, wurde eine statistische Prüfung der Sensitivität und Spezifität durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: LOXL4 als diagnostischer Marker zur Differenzierung zwischen Low-Grade- und High-Grade-Tumoren

LOXL4	Tumorgroße		Gesamt [n]	Sensitivität (positiver prädiktiver Wert)	Spezifität (negativer prädiktiver Wert)	Youden- Index	P- Wert
	T1/T2 (Low- Grade) [n]	T3/T4 (High- Grade) [n]					
-	2 (16,7%)	8 (9,6%)	10 (10,5%)	90,4% (90,2%)	16,7% (16,9%)	0,071	0,61
+ / + + / + + +	10 (83,3%)	75 (90,4%)	85 (89,5%)				
- / +	8 (66,7%)	23 (27,7%)	31 (32,6%)	72,3% (81,8%)	66,7% (53,8%)	0,39	0,011
+ + / + + +	4 (33,3%)	60 (72,3%)	64 (67,4%)				
Gesamt	12 (100%)	83 (100%)	95 (100%)				

Bezugnehmend auf die in der Tabelle 8 aufgeführten Werte erhält man bei der Unterscheidung zwischen negativer und positiver LOXL4-Expression eine Sensitivität von 90,4%. Dabei wurden 75 von 83 High-Grade-Tumoren korrekt erkannt. Die Spezifität lag bei 16,7%, da zwei von zwölf Low-Grade-Tumoren richtig erkannt wurden.

Bei einer Unterscheidung zwischen schwacher und starker Ausprägung sank die Sensitivität auf 72,3%; die Spezifität stieg auf 66,7%. Es ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Gruppen „niedrige Expression“ (- / +) und

„hohe Expression“ (++)/ (++++) mit $p=0,011$ (Chi-Quadrat-Test, Zusammenhang linear-mit-linear).

Dass der Test, der zwischen starker und schwacher LOXL4-Expression differenziert, als diagnostisches Mittel besser geeignet ist, zeigt auch der höhere Youden-Index von 0,39 im Gegensatz zu 0,071.

4.3. LOXL4-Expression im Verhältnis zum Nodalstatus

Insgesamt ließ die Datenlage eine Auswertung von 96 Proben zu. In Tabelle 9 sind die LOXL4-Expression und der Nodalstatus der Proben dargestellt. In der Grafik in Abbildung 3 wird der Zusammenhang zwischen zunehmendem Nodalstatus und dem Anteil an höheren LOXL4-Expressionen gezeigt.

Tabelle 9: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Nodalstatus

LOXL4-Expression		Nodalstatus		Gesamt [n]
		N0 [n]	N1 [n]	
Niedrig <30%	-	6 (23,1%)	5 (7,1%)	11 (11,5%)
	+	10 (38,5%)	11 (15,7%)	21 (21,9%)
Hoch ≥30%	++	5 (19,2%)	26 (37,1%)	31 (32,3%)
	+++	5 (19,2%)	28 (40,0%)	33 (34,4%)
Gesamt		26 (100%)	70 (100%)	96 (100%)

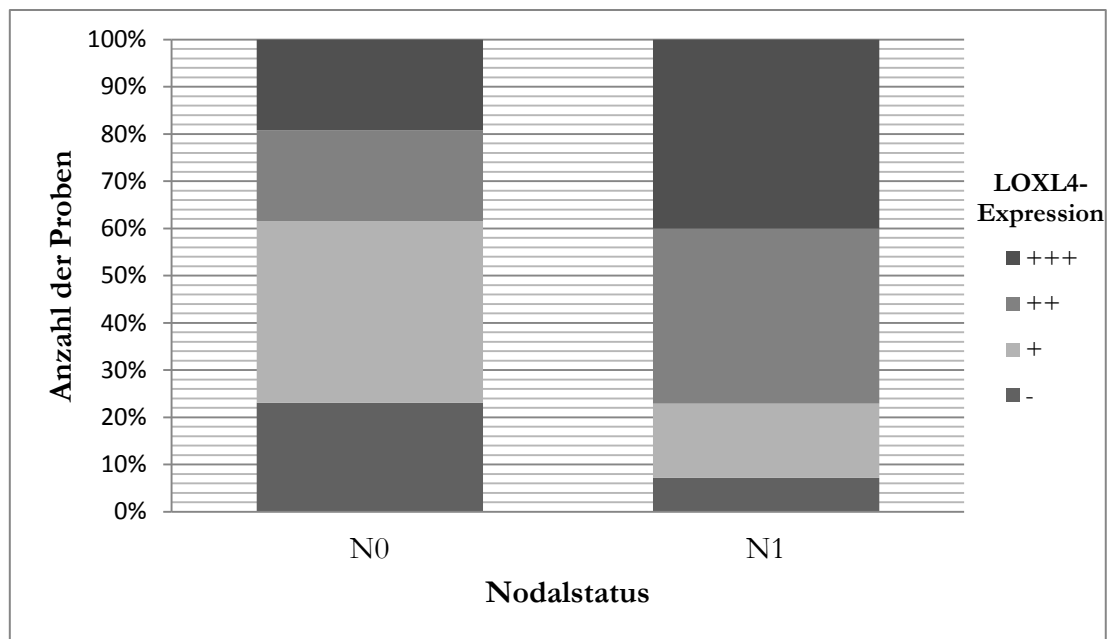


Abbildung 3: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Nodalstatus

Zusätzlich wurde eine statistische Prüfung der Sensitivität und Spezifität durchgeführt, die Ergebnisse sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: LOXL4 als diagnostischer Marker zur Differenzierung zwischen positivem und negativem Nodalstatus

LOXL4	Nodalstatus		Gesamt [n]	Sensitivität (positiver prädiktiver Wert)	Spezifität (negativer prädiktiver Wert)	Youden- Index	P- Wert
	N0 [n]	N1 [n]					
-	6 (23,1%)	5 (7,1%)	11 (11,5%)	92,9% (76,5%)	23,1% (54,7%)	0,16	0,039
+ / +++ / +++	20 (76,9%)	65 (92,9%)	85 (88,5%)				
- / +	16 (61,5%)	16 (22,9%)	32 (33,3%)	77,1% (84,3%)	61,5% (50%)	0,386	0,001
++ / ++++	10 (38,5%)	54 (77,1%)	64 (66,7%)				
Gesamt	26 (100%)	70 (100%)	96 (100%)				

Bei einer Unterscheidung zwischen negativer und positiver LOXL4-Expression erhält man eine Sensitivität von 92,9%. Dabei wurden 65 von 70 Tumoren mit hohem Nodalstatus korrekt erkannt. Die Spezifität lag bei 23,1%, da sechs von 26 Tumoren mit niedrigem Nodalstatus richtig erkannt wurden.

Bei einer Unterscheidung zwischen schwacher und starker Ausprägung sank die Sensitivität auf 77,1%; die Spezifität stieg auf 61,5%. Es ergab sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Gruppen „niedrige Expression“ (-/+) und „hohe Expression“ (++/+++) von $p=0,001$ (Chi-Quadrat-Test, Zusammenhang linear-mit-linear).

Dass der Test, der zwischen einer starken und schwachen Ausprägung der LOXL4-Expression differenziert, als diagnostisches Mittel besser geeignet ist, zeigt auch der höhere Youden-Index von 0,386 im Gegensatz zu 0,16.

4.4. LOXL4-Expression im Verhältnis zum Auftreten von Fernmetastasen

Insgesamt ließ die Datenlage eine Auswertung von 98 Proben zu. In Tabelle 11 sind die LOXL4-Expression und das Auftreten von Fernmetastasen der Proben dargestellt. In der Grafik in Abbildung 4 wird der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Fernmetastasen und dem Anteil an höheren LOXL4-Expressionen gezeigt.

Tabelle 11: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Auftreten von Fernmetastasen

LOXL4-Expression		Auftreten von Fernmetastasen		Gesamt [n]
		M0 [n]	M1 [n]	
Niedrig <30%	-	10 (11,6%)	1 (8,3%)	11 (11,2%)
	+	18 (20,9%)	3 (25%)	21 (21,4%)
Hoch ≥30%	++	28 (32,6%)	3 (25%)	31 (31,6%)
	+++	30 (34,9%)	5 (41,7%)	35 (35,7%)
Gesamt		86 (100%)	12 (100%)	98 (100%)

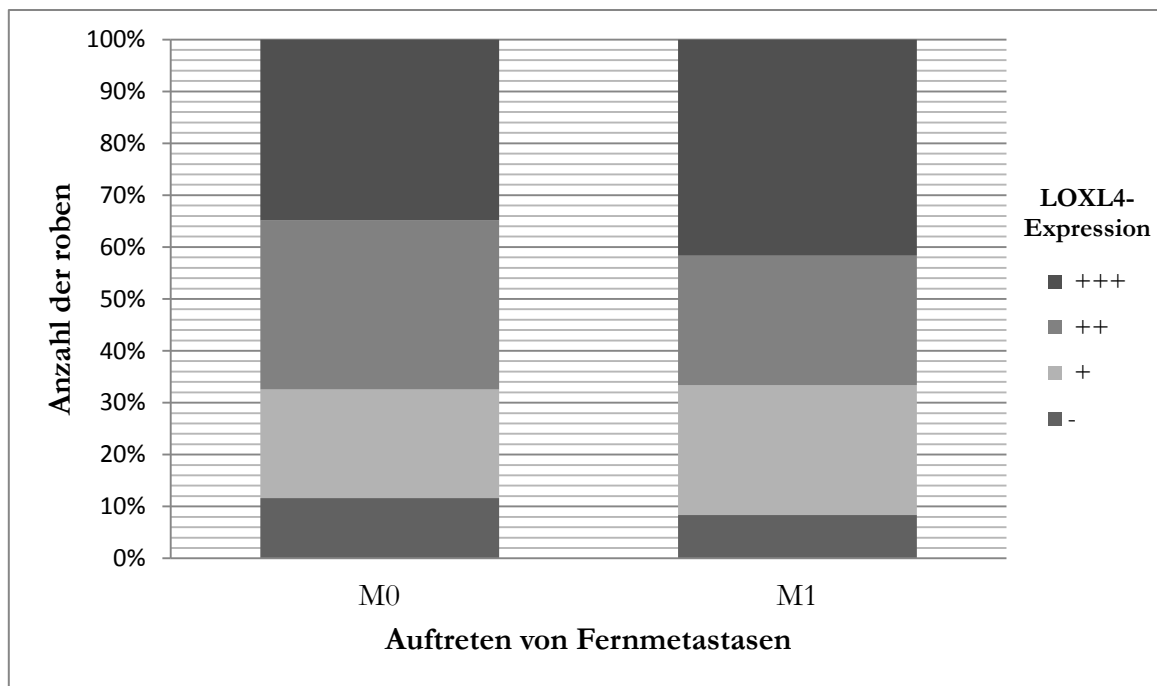


Abbildung 4: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Auftreten von Fernmetastasen

Zusätzlich wurde eine statistische Prüfung der Sensitivität und Spezifität durchgeführt. Die Ergebnisse dazu sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Auftreten von Fernmetastasen

LOXL4	Auftreten von Fernmetastasen		Gesamt [n]	Sensitivität (Positiv prädiktiver Wert)	Spezifität (negativer prädiktiver Wert)	Youden-Index	P-Wert
	M0 [n]	M1 [n]					
-	10 (11,6%)	1 (8,3%)	11 (11,2%)	91,7% (12,6%)	11,6% (90,9%)	0,0329	0,598
+ / +++	76 (88,4%)	11 (91,7%)	87 (88,8%)				
- / +	28 (32,6%)	4 (33,3%)	32 (32,7%)	66,7% (12,1%)	32,6% (87,5%)	-0,0077	0,597
++ / +++	58 (67,4%)	8 (66,7%)	66 (67,3%)				
Gesamt [n]	86	12	98				

Bei einer Unterscheidung zwischen negativer und positiver LOXL4-Expression erhält man eine Sensitivität von 91,7%. Dabei wurden 11 von 12 Tumoren mit Fernmetastasen korrekt erkannt. Die Spezifität lag bei 11,6%, da zehn von 86 Tumoren ohne Fernmetastasen richtig erkannt wurden. Bei einer Unterscheidung zwischen schwacher und starker Ausprägung sank die Sensitivität auf 66,7%; die Spezifität stieg auf 32,6%. Es stellte sich heraus, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Stärke der LOXL4-Expression und dem Auftreten von Fernmetastasen besteht, da $p=0,598$ bzw. $p=0,597$ (Chi-Quadrat-Test, Zusammenhang linear-mit-linear). Dass beide Tests, die zwischen einer starken und schwachen Ausprägung der LOXL4-Expression differenzieren, als diagnostisches Mittel nicht geeignet sind, zeigen auch die sehr niedrigen beziehungsweise negativen Youden-Indices von 0,0329 und -0,0077.

4.5. LOXL4-Expression im Verhältnis zum Grading

In Tabelle 13 ist der Zusammenhang zwischen der LOXL4-Expression und dem Grading dargestellt. Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Gruppen „niedrige Expression“ (-/+) und „hohe Expression“ (++)/+++) und dem Grading, da $p=0,421$ (Chi-Quadrat-Test, Zusammenhang linear-mit-linear).

Tabelle 13: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Grading

LOXL4-Expression		Grading				Gesamt [n]
		G1 [n]	G2 [n]	G3 [n]	G4 [n]	
Niedrig <30%	-/+	1 (11,1%)	18 (34%)	12 (35,3%)	0 (0%)	31 (32%)
Hoch ≥30%	++/+++	8 (88,9%)	35 (66%)	22 (64,7%)	1 (100%)	66 (68%)
Gesamt		9 (100%)	53 (100%)	34 (100%)	1 (100%)	97 (100%)

4.6. LOXL4-Expression im Verhältnis zum Staging

In Tabelle 14 ist die LOXL4-Expression im Verhältnis zum Staging dargestellt. Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Gruppen „niedrige Expression“ (-/+) und „hohe Expression“ (++)/ (++++) und dem Staging, da $p=0,303$ (Chi-Quadrat-Test, Zusammenhang linear-mit-linear).

Tabelle 14: LOXL4-Expression im Verhältnis zum Staging

LOXL4-Expression		Staging				Gesamt [n]
		1a, 1b [n]	2a, 2b [n]	3a, 3b [n]	4 [n]	
Niedrig <30%	-/+	6 (85,7%)	20 (29,4%)	1 (14,3%)	5 (38,5%)	32 (33,7%)
Hoch ≥30%	++/++++	1 (14,3%)	48 (70,6%)	6 (85,7%)	8 (61,5%)	63 (66,3%)
Gesamt		7 (100%)	68 (100%)	7 (100%)	13 (100%)	95 (100%)

4.7. Gesamtüberleben des Patientenkollektivs

Wie aus Tabelle 15 hervorgeht, lag die durchschnittliche 2-Jahres-Überlebensrate bei 29,7%, während die 5-Jahres-Überlebensrate lediglich 3,8% betrug. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten lag bei 15,9 Monaten. Insgesamt lagen zu 78 Patienten Daten für diesen Überlebenszeitraum vor. Das Koordinatensystem in Abbildung 5 veranschaulicht die Überlebenskurve aller Patienten.

Tabelle 15: Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve des Patientenkollektivs

Gesamtzahl [n]	Ereignisse [n]	Zensurierungen [n]	2-Jahres- Überlebens- rate	5-Jahres- Überlebens- rate	Mittlere Überlebenszeit [Monate]
78	62 (79,5%)	62 (20,5%)	29,7 %	3,8 %	15,9

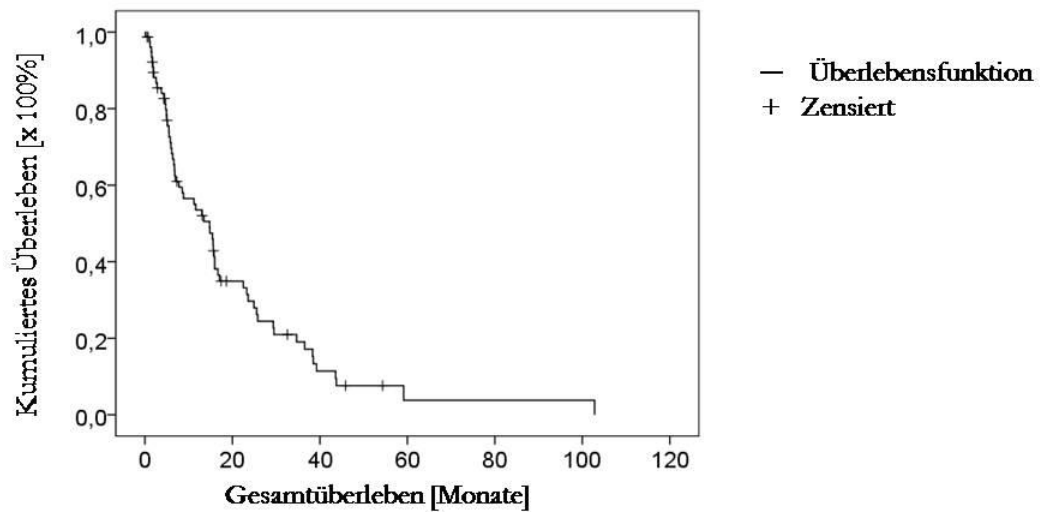


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve des gesamten Patientenkollektivs

4.8. Gesamtüberleben des Patientenkollektivs im Verhältnis zur Tumorgröße

Im Folgenden wurde ein Vergleich zwischen der Überlebenszeit und der Tumorgröße gezogen; die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 16 abgebildet. Es lagen zu 75 Patienten Daten für den Überlebenszeitraum vor. Es zeigte sich in diesem Kollektiv, dass eine geringere Tumorgröße mit einer geringeren Überlebensrate einhergeht. Bei den höheren Tumorgrößen T3 oder T4 betrug die 2-Jahres-Überlebensrate 30,8% und die 5-Jahres-Überlebensrate 4,2%.

Insgesamt konnte kein Zusammenhang zwischen der Tumorgröße und den Überlebensraten hergestellt werden. Dies wurde durch den Log-Rank-Test mit seiner fehlenden Signifikanz ($p = 0,216$) bestätigt. In Abbildung 6 findet sich die grafische Darstellung des Gesamtüberlebens der Patienten im Verhältnis zur Tumorgröße.

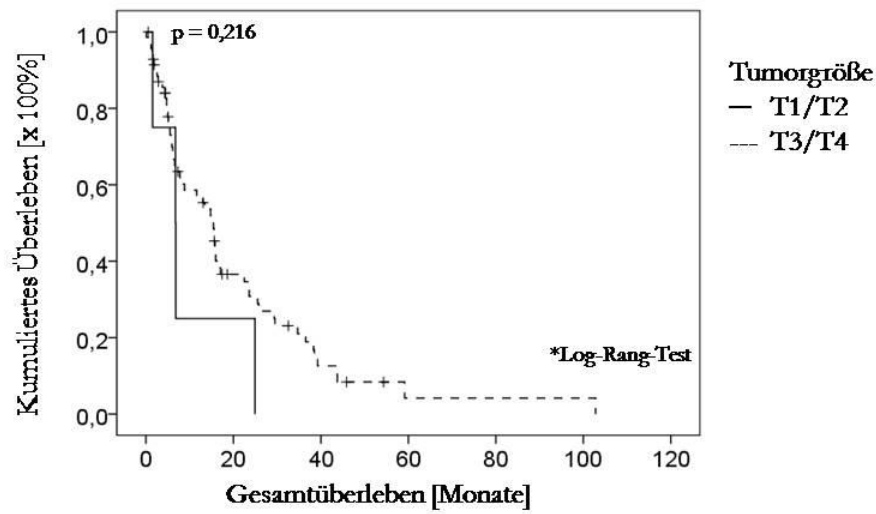


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve des Patientenkollektivs im Verhältnis zur Tumorgröße

Tabelle 16: Gesamtüberleben des Patientenkollektivs in Abhängigkeit zur Tumorgröße

Tumorgröße	Gesamtzahl [n]	Ereignisse [n]	Zensierungen [n]	2-Jahres-Überlebensrate	5-Jahres-Überlebensrate	Mittlere Überlebenszeit [Monate]	Log-Rang-Test
T1-T2	5	4 (80%)	1 (20%)	25%	0%	9,99	
T3-T4	70	56 (80%)	14 (20%)	30,8%	4,2%	15,91	p= 0,216
Gesamt	75	60 (80%)	15 (20%)				

4.9. Gesamtüberleben des Patientenkollektivs im Verhältnis zur LOXL4-Expressionsstärke

Zu 78 Patienten lagen Daten für den Überlebenszeitraum vor. Bei einem Vergleich zwischen negativer und schwacher LOXL4-Expression (-/+) versus moderater und starker LOXL4-Expression (++/+++) mit der Überlebenszeit wurde jedoch keine statistisch signifikante Korrelation festgestellt ($p=0,715$). Die Ergebnisse dazu sind in Tabelle 17 abgebildet. Die durchschnittliche 2-Jahres-Überlebensrate lag bei beiden Expressionsgruppen (negativ und schwach versus moderat und stark) bei 36,5%. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei der negativen und schwachen Expressionsgruppe bei 0%. Bei der moderaten und starken Expressionsgruppe lag sie bei 6,1%. In dem Koordinatensystem in Abbildung 7 findet sich die Überlebenskurve in Relation zur LOXL4-Expression zu allen Patienten:

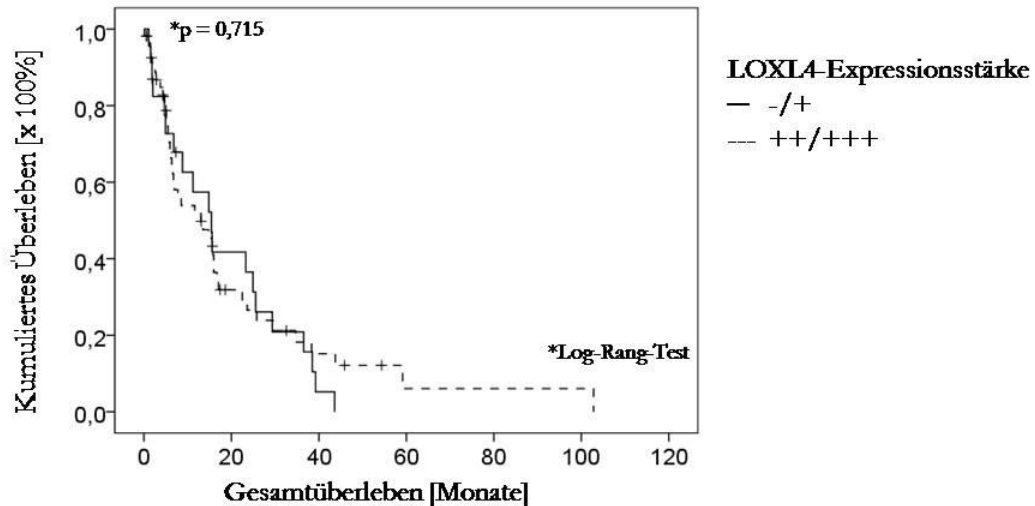


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve des Patientenkollektivs im Verhältnis zur hohen und geringen LOXL4-Expression

Tabelle 17: Gesamtüberleben des Patientenkollektivs im Verhältnis zur LOXL4-Expressionsstärke

LOXL4- Expres- sion	Gesamt- zahl [n]	Ereig- nisse [n]	Zensier- ungen [n]	2-Jahres- Überlebens- rate	5-Jahres- Überlebens- -rate	Mittlere Überlebens- zeit [Monate]	Log- Rang- Test
Niedrig <30%	23	20 (87%)	3 (13%)	36,5 %	0%	15,62	
Hoch ≥30%	55	42 (76,4%)	13 (23,6%)	36,5%	6,1%	14,83	p= 0,715
Gesamt	78	62 (79,5%)	16 (20,5%)				

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die LOXL4-Expression von 103 Patienten mit Pankreaskarzinomen immunhistochemisch untersucht und der TNM-Klassifikation, dem Grading und dem Staging gegenübergestellt. Außerdem wurde die LOXL4-Expression mit dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert, welches durch das Kaplan-Meier-Verfahren ermittelt worden war. Es ergab sich insgesamt eine Expression von LOXL4 in 88,3% aller Pankreaskarzinomproben. Außerdem ergab sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Expressionsstärke von LOXL4 und der Tumorgröße sowie zwischen der Expressionsstärke von LOXL4 und dem Nodalstatus. Ähnlich hohe LOXL4-Expressionen sind bereits in vorherigen Arbeiten für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereiches beschrieben worden. Dort bestand auch eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Expressionsstärke von LOXL4 und der Tumorgröße (Görögh et al. 2007). Diercks und Mitarbeiter verglichen die LOXL4-Expressionsstärken in Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx und stellten auch eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der LOXL4-Expressionsstärke und der Tumorgröße fest (Diercks et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit bestand ferner eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Expressionsstärke von LOXL4 und dem Nodalstatus. Eine Beobachtung, die auch Görögh und Mitarbeiter bei den Untersuchungen an Kopf-Hals-Karzinomen gemacht hatten und postulierten, dass LOXL4 bei Kopf-Hals-Karzinomen ein Nutzen als diagnostischer Marker zukäme (Görögh et al. 2008). Der alleinige Einsatz immunhistochemischer Färbungen würde allerdings nicht zur Diagnosestellung ausreichen, sondern könnte lediglich die zytopathologischen Kenntnisse des Untersuchers ergänzen sowie das Stellen einer Differentialdiagnose erleichtern.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit keine Korrelation zwischen der LOXL4-Expression und dem Auftreten von Fernmetastasen festgestellt werden. Dies steht

im Gegensatz zu den Ergebnissen der Untersuchungen an Kopf-Halskarzinomen. Diese zeigten bei invasivem und metastasierendem Verhalten eine erhöhte LOXL4-Expression im Vergleich zu ihrem nichtinvasivem und -metastasierendem Pendant (Görögh et al. 2007). Insgesamt ergänzt die vorliegende Arbeit die vorangegangenen Untersuchungen und bestätigt einen Teil ihrer Ergebnisse.

In anderen Studien zeigte LOXL4 hingegen keine tumorfördernde, sondern tumorsupprimierende Eigenschaften und damit eine dualistische Wirksamkeit. So fanden Ren und Mitarbeiter bei Prostatakarzinomen mit verstärktem Metastasierungsverhalten einen Verlust der LOXL4-Expression, während die LOXL4-Expression in primären Prostatakarzinomen anhaltend hoch war (Ren et al. 1998). In einem anderen Versuch zeigten in Ratten implantierte Fibroblasten, bei denen das LOXL4-Gen ausgeschaltet worden war, sowohl eine drastische phänotypische Veränderung als auch ein stark karzinogenes Verhalten (Giampuzzi et al. 2001). Auch in Ratten eingebrachte Zellen von Mammakarzinomen, in denen LOXL4 inhibiert war, zeigten ein stärkeres Wachstum als die Brustkrebszellen, in denen LOXL4 nicht ausgeschaltet worden war (Choi et al. 2017). Csiszar und Mitarbeiter wiesen nach, dass eine verringerte beziehungsweise nicht mehr vorhandene Funktion von LOX bei der Entwicklung von Kolonkarzinomen eine direkte Konsequenz von somatischen Mutationen des LOX-Gens in der Genregion 5q23.1 ist. Die verringerte beziehungsweise nicht mehr vorhandene Funktion von LOX trug letztlich zu einer Progression des Kolonkarzinoms bei (Csiszar et al. 2002).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Wu und Mitarbeiter (2007), als sie die LOXL4-Expression von Blasenkarzinomen in Hinblick auf ihre klinische Entwicklung untersuchten. In den begutachteten Blasenkarzinomzellen war sowohl das Protoonkogen Ras mutiert, als auch der Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-Signalweg übermäßig aktiviert, gleichzeitig waren Lysyl oxidase-like 1 (LOXL1) und LOXL4 durch Hypermethylierung ausgeschaltet. Sobald LOXL1 und LOXL4 in ausgewählte Linien von Blasenkarzinomzellen eingebracht wurden,

wurde der ERK-Signalweg inhibiert. Dies führte zu einer deutlich verringerten Fähigkeit der Karzinomzellen, Absiedlungen zu bilden. Demnach schien LOXL4 hier als Tumorsupressorgen zu wirken, das die Aktivierung von Ras inhibierte, sodass der ERK-Signalweg der Blasenkarzinomzellen gestört und ihre Proliferation verlangsamt war. Diese Wirkung war bei LOXL1 noch stärker ausgeprägt als bei LOXL4. Wu und Mitarbeiter wiesen daher auf einen möglichen therapeutischen Nutzen von LOXL1 und LOXL4 hin (Wu et al. 2007).

Zu der Rolle von LOXL4 als tumorfördernd beziehungsweise tumorsupprimierend formulierten Nilsson und Mitarbeiter, dass es auf den Zeitpunkt der einsetzenden LOXL4-Wirkung ankäme, ob sich die Bildung maligner Zellen verlangsamte oder beschleunigte. In ihrer Studie implantierten sie Prostatakarzinomzellen von Ratten in gesundes Prostatagewebe und beobachteten das Wachstum dieser Karzinomzellen. War in dem umliegenden gesunden Prostatagewebe vor der Implantation der Prostatakarzinomzellen die LOXL4-Expression reduziert worden, war auch das Wachstum der Prostatakarzinomzellen verringert. Anders verhielt es sich, wenn die LOXL4-Expression nach der Implantation der Prostatakarzinomzellen inhibiert wurde; es war in der Folge ein gleich schnelles oder schnelleres Wachstum der Karzinomzellen zu beobachten. Entsprechend folgerten die Autoren, dass die Wirkung von LOXL4 zumindest bei Prostatakarzinomen kontextabhängig sei (Nilsson et al. 2016).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Zusammenhang von LOXL4 mit dem Auftreten von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika. Deng und Mitarbeiter demonstrierten, dass in Blasenkarzinomzellen das miR-193a-3p-Gen zu einer verringerten LOXL4-Expression führte und durch den Oxidative-Stress-Pathway eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bewirkte. Der Oxidative-Stress-Pathway bewirkt generell verstärkte zelluläre Überlebens- und Verteidigungsmöglichkeiten, die auch zu einer Wirkungsabschwächung von Chemotherapeutika führen. Die Induktion einer erhöhten Resistenz von Karzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika ließ sich auch durch eine

ausschließliche Senkung der LOXL4-Expression erzielen; auch hier wurde der Oxidative-Stress-Pathway aktiviert (Deng et al. 2014). Durch diese Erkenntnisse kann ein Therapieversagen eines Blasenkarzinoms einerseits diagnostisch eingeordnet werden; andererseits ist auch ein therapeutischer Nutzen grundsätzlich denkbar.

Ein erstes potentiell therapeutisches Vorgehen mit Hilfe von LOXL4 wurde erstmals 2008 von Weise und Mitarbeitern beschrieben. Sie haben in aus peripherem Blut gewonnene dendritische Zellen LOXL4-mRNA eingebracht. Diese so veränderten Zellen wurden nach einer Reifephase einer Probe peripheren Blutes zugeführt, wo sie T-Zellen zu einer gesteigerten Synthese von Interferon- γ anregten. Die Synthese war deutlich stärker ausgeprägt als die der T-Zellen, die zuvor von unveränderten dendritischen Zellen stimuliert worden waren (Weise et al. 2008). Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass LOXL4 tatsächlich das Potential hat, therapeutisch eingesetzt zu werden.

In der Vergangenheit wurde die Expressionsstärke von LOXL4 in verschiedenen Tumorgewebeproben mehrmals mit denen anderer Gene verglichen, zum Beispiel dem für den Epidermal growth factor receptor (EGFR) und Survivin. EGFR ist bekannt dafür, zur Tumorentstehung und -progression in verschiedenen Geweben beizutragen und ist therapeutisches Ziel des monoklonalen Antikörpers Cetuximab (Baselga 2001). Es wurde festgestellt, dass die Expressionsstärken von sowohl LOXL4 als auch EGFR in metastasierenden Kopf-Hals-Karzinomen erhöht ist, wobei LOXL4 eine höhere Selektivität aufwies (Scola et al. 2010). Ein Vergleich, ob LOXL4 oder EGFR eine höhere diagnostische und prognostische Wertigkeit in Pankreaskarzinomen hat, wäre insofern erstrebenswert. Survivin ist ein apoptosehemmendes Gen, das besonders in malignem Gewebe überexprimiert ist und mit einer schlechteren Überlebensrate zum Beispiel bei Kolorektalkarzinomen korreliert (Kawasaki et al. 1998; Sarela 2000). In der Vergangenheit wurden anhand von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx die Expressionsstärken von LOXL4 und Survivin mit histopathologischen und klinischen Parametern

korreliert. Survivin zeigte dabei Vorteile in der Bestimmung prognostischer Parameter, während LOXL4 als Diagnostikum geeignet schien. Letztlich wurde festgestellt, dass besonders die Auswertung von LOXL4 und Survivin gemeinsam eine hohe diagnostische Sicherheit bietet (Diercks et al. 2015). Auch in dieser vorliegenden Untersuchung wurde festgestellt, dass LOXL4 eher als Diagnostikum und weniger als prognostischer Marker einsetzbar ist, da die Korrelation mit den Überlebensdaten statistisch nicht signifikant war. Eine Ergänzung der spezifischen Expressionsmuster von sowohl Survivin als auch EGFR im Vergleich zu dem von LOXL4 in Pankreaskarzinomen wäre in diesem Kontext interessant.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Daten mittels einer immunhistochemischen Färbung und anschließender Auswertung am Lichtmikroskop gewonnen. Eine Alternative hierzu ist die Bestimmung der LOXL4-mRNA-Expression in Gewebeproben mittels Elektrophorese. Diese lässt zwar einen genauen Vergleich der Expressionsstärke verschiedener Gene zu, wie zum Beispiel EGFR und LOXL4, macht aber die Quantifizierung immunhistochemisch gefärbter Gewebestrukturen nicht möglich.

Die in der Auswertung genutzten Daten wurden aus der Datenbank „ProWebDB“ des UKSH Campus Kiel übernommen. Die allgemeine Datenlage erwies sich besonders zu den histopathologischen Parametern als gut, so lagen Angaben bezüglich Tumorgröße, Nodalstatus, Existenz von Fernmetastasen, Grading und Staging zu jeweils 95 oder mehr der 103 untersuchten Gewebeproben vor. Bei 78 Patienten konnte zudem die Dauer des Überlebens ermittelt werden, während bei den verbleibenden 25 Patienten die Überlebensdauer unklar blieb. In Hinblick auf die sehr ungünstige Prognose des Pankreaskarzinoms ist davon auszugehen, dass auch die meisten dieser 25 Patienten innerhalb eines kurzen Zeitraums an ihrer Krankheit verstorben sind. Die 5-Jahres-Überlebensrate der in unserer Untersuchung eingeschlossenen Patienten betrug lediglich 3,8% und lag damit noch unter der vom Robert-Koch-Institut für Pankreaskarzinom-Patienten

ermittelten durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von 7% (Robert-Koch-Institut 2012).

Der Nutzen von LOXL4 als prognostischer Marker wird kontrovers diskutiert. In unserer Untersuchung wurde keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der LOXL4-Expression und dem Gesamtüberleben der Patienten gefunden. Eine geringere Tumorgroße von T1 und T2 ging mit einer geringeren Überlebensrate einher als eine höhere Tumorgroße von T3 oder T4. Dies steht im Widerspruch zu früheren Erkenntnissen, nach denen eine umfangreichere Tumorgroße signifikant mit einer ungünstigeren Überlebensrate korreliert (Geer et al. 1993).

Es fiel auch auf, dass 6,1% der Patienten, bei deren Pankreaskarzinom LOXL4 moderat oder stark ausgeprägt war, fünf Jahre nach Diagnosestellung noch lebten, während zu dem Zeitpunkt keiner der Patienten mit schwacher oder gar keiner LOXL4-Expression noch am Leben war. Obwohl statistisch nicht signifikant, ist dies insofern auffällig, als dass eine höhere LOXL4-Expression mit ungünstigeren pathologischen Parametern korrelierte, nämlich sowohl einer fortgeschrittenen Tumorgroße als auch einem höheren Nodalstatus. Weise und Mitarbeiter machten in ihrer Untersuchung an Kopf-Hals-Karzinomen die gleiche Beobachtung, ohne eine abschließende Erklärung finden zu können; sie beobachteten eine längere Überlebensdauer bei Patienten mit starker LOXL4-Expression in Lymphknotenmetastasen, auch wenn diese statistisch nicht signifikant war (Weise et al. 2008). Diese Befunde korrespondieren mit den Ergebnissen von Choi und Mitarbeitern, die einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen schwacher LOXL4-Expression und geringerem Gesamtüberleben bei Brustkrebspatienten feststellten (Choi et al. 2017). Eine Korrelation zwischen schwacher LOXL4-Expression und geringerem Gesamtüberleben und insgesamt höheren Rezidivraten wurde auch bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom bemerkt (Tian et al. 2015). Auf der anderen Seite wiesen Patienten mit Nasopharynxkarzinomen, in denen LOXL4 stark ausgeprägt war, eine niedrigere 5-Jahres-Überlebensrate, eine niedrigere metastasenfreie Überlebensrate und eine

niedrigere Gesamtüberlebensrate auf (Hua et al. 2016). Die Gründe für die bei den verschiedenen LOXL4-Expressionsstärken unterschiedlichen Überlebensraten der Patienten bleiben unklar; das Zusammenwirken von LOXL4 in verschiedenen Zellarten ist noch nicht abschließend geklärt (Weise et al. 2008).

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, bei 103 histopathologisch gesicherten Tumorpoben von Patienten mit Pankreaskarzinomen LOXL4, das zur Familie der Lysyloxidasen gehört und die Quervernetzung von Kollagen und Elastin katalysiert und damit eine wesentliche Rolle bei der Bildung der extrazellulären Matrix spielt, immunhistologisch zu untersuchen und nähere Aufschlüsse über dessen Expression in Zusammenhang mit klinisch relevanten Parametern zu erlangen. Von den insgesamt 103 histopathologisch gesicherten Tumorproben von Patienten mit Pankreaskarzinomen wurden insgesamt 91 (88,3%) positiv auf LOXL4 getestet. Der LOXL4-Marker wies im Hinblick auf die Frage, ob Pankreaskarzinomzellen in einem Gewebe vorhanden sind oder nicht, eine Sensitivität von 90,4% auf. Es ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer verstärkten LOXL4-Expression und einer zunehmenden Tumorgroße. Ferner fand sich bei der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen positivem Nodalstatus und dem Anteil höherer LOXL4-Expression eine hoch signifikante Korrelation. Kein signifikanter Zusammenhang wurde zwischen einer gesteigerten LOXL4-Expression und dem vermehrten Auftreten von Fernmetastasen beobachtet. Weiterhin bestand weder zu dem Grading, noch zu dem Staging eine statistisch nachweisbare Korrelation mit einer erhöhten LOXL4-Expression. Es konnte keine statistisch signifikante Beziehung zwischen dem Gesamtüberleben der Patienten und der Tumorgroße

ermittelt werden. Auch für die Beziehung zwischen dem Gesamtüberleben der Patienten und dem Auftreten von LOXL4 war dies nicht der Fall.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Ausprägung von LOXL4 in Pankreaskarzinomen diskutiert. Festgestellt wurde, dass LOX4 vor allem als Diagnostikum Vorteile bietet. Sein Nutzen als prognostischer Marker konnte in dieser Untersuchung nicht gesichert werden. Trotzdem hat der Antikörper das Potential, klinisch erfolgreich genutzt zu werden.

Literaturverzeichnis

1. **Rassow, J.** (2008): Biochemie. 50 Tabellen. 2., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://www.thieme.de/ebooklibrary/inhalte/3131253517/index.html>.
2. **Kagan, H.M.; Trackman, P.C.** (1991): Properties and function of lysyl oxidase. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 5 (3), S. 206–210. DOI: 10.1165/ajrcmb/5.3.206.
3. **Csiszar, K.** (2001): Lysyl oxidases. A novel multifunctional amine oxidase family. In: *Bd. 70: Elsevier (Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology)*, S. 1–32.
4. **Giampuzzi, M.; Botti, G.; Cilli, M.; Gusmano, R.; Borel, A.; Sommer, P.; Di Donato, A.** (2001): Down-regulation of lysyl oxidase-induced tumorigenic transformation in NRK-49F cells characterized by constitutive activation of ras proto-oncogene. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (31), S. 29226–29232. DOI: 10.1074/jbc.M101695200.
5. **Li, R.-K.; Zhao, W.-Y.; Fang, F.; Zhuang, C.; Zhang, X.-X.; Yang, X.-M. et al.** (2015): Lysyl oxidase-like 4 (LOXL4) promotes proliferation and metastasis of gastric cancer via FAK/Src pathway. In: *Journal of cancer research and clinical oncology* 141 (2), S. 269–281. DOI: 10.1007/s00432-014-1823-z.
6. **Kagan, H.M.; Reddy, V.B.; Panchenko, M.V.; Nagan, N.; Boak, A.M.; Gacheru, S.N.; Thomas, K.M.** (1995): Expression of lysyl oxidase from cDNA constructs in mammalian cells. The propeptide region is not essential to the folding and secretion of the functional enzyme. In: *Journal of cellular biochemistry* 59 (3), S. 329–338. DOI: 10.1002/jcb.240590305.
7. **Trackman, P.C.** (2016): Lysyl Oxidase Isoforms and Potential Therapeutic Opportunities for Fibrosis and Cancer. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 20 (8), S. 935–945. DOI: 10.1517/14728222.2016.1151003.

8. **Yap, N.V.L.; Whelan, F.J.; Bowdish, D.M.E.; Golding, G.B.** (2015): The Evolution of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain of the Class A Scavenger Receptors. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 342. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00342.
9. **Kirschmann, D.A.; Seftor, E.A.; Fong, S.F.T.; Nieva, D.R.C.; Sullivan, C.M.; Edwards, E.M. et al.** (2002): A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. In: *Cancer research* 62 (15), S. 4478–4483.
10. **Holtmeier, C.; Görögh, T.; Beier, U.; Meyer, J.; Hoffmann, M.; Gottschlich, S. et al.** (2003): Overexpression of a novel lysyl oxidase-like gene in human head and neck squamous cell carcinomas. In: *Anticancer research* 23 (3B), S. 2585–2591.
11. **Görögh, T.; Weise, J.B.; Holtmeier, C.; Rudolph, P.; Hedderich, J.; Gottschlich, S. et al.** (2007): Selective upregulation and amplification of the lysyl oxidase like-4 (LOXL4) gene in head and neck squamous cell carcinoma. In: *The Journal of pathology* 212 (1), S. 74–82. DOI: 10.1002/path.2137.
12. **Asuncion, L.; Fogelgren, B.; Fong, K.S.K.; Fong, S.F.T.; Kim, Y.; Csiszar, K.** (2001): A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain. In: *Matrix Biology* 20 (7), S. 487–491. DOI: 10.1016/S0945-053X(01)00161-5.
13. **Mäki, J.M.; Tikkanen, H.; Kivirikko, K.I.** (2001): Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme. The third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains. In: *Matrix Biology* 20 (7), S. 493–496. DOI: 10.1016/S0945-053X(01)00157-3.
14. **Görögh, T.; Holtmeier, C.; Weise, J. B.; Hoffmann, M.; Ambrosch, P.; Laudien, M.; Csiszar, K.** (2008): Functional analysis of the 5' flanking domain of the LOXL4 gene in head and neck squamous cell carcinoma cells. In: *International journal of oncology* 33 (5), S. 1091–1098.

15. **Robert-Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland** (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausg. Berlin (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes).
16. **Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF)** (2013): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, AWMF Registernummer: 032-010OL, http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-010OL_S3_Exokrines_Pankreaskarzinom_21112013-verlaengert.pdf
17. **Warszawski, N.; Link, K.H.; Warszawski, A.; Lutz, M.P.; Gansauge, F.; Schneider, B.M.; Röttinger, E.M.** (1999): Der Einfluß der Therapie auf das Überleben von Patienten mit Pankreaskarzinom. In: *Strahlentherapie und Onkologie* 175 (7), S. 315–319. DOI: 10.1007/s000660050017.
18. **Hingorani, S.R.; Petricoin, E.F.; Maitra, A.; Rajapakse, V.; King, C.; Jacobetz, M.A. et al.** (2003): Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. In: *Cancer Cell* 4 (6), S. 437–450. DOI: 10.1016/S1535-6108(03)00309-X.
19. **Munding, J.; Tannapfel, A.** (2012): Übersicht – Pankreaskarzinome. Ätiologie und Epidemiologie. In: *TumorDiagn u Ther* 33 (08), S. 454–457. DOI: 10.1055/s-0032-1319092.
20. **Everhart, J.** (1995): Diabetes Mellitus as a Risk Factor for Pancreatic Cancer. In: *JAMA* 273 (20), S. 1605. DOI: 10.1001/jama.1995.03520440059037.
21. **Pinho, A.V.; Chantrill, L.; Rومان, I.** (2014): Chronic pancreatitis. A path to pancreatic cancer. In: *Cancer letters* 345 (2), S. 203–209. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.08.015.
22. **Kamisawa, T.; Wood, L.D.; Itoi, T.; Takaori, K.** (2016): Pancreatic cancer. In: *The Lancet* 388 (10039), S. 73–85. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00141-0.

23. **Lin, R.S.; Kessler, I.I.** (1981): A Multifactorial Model for Pancreatic Cancer in Man. In: *JAMA* 245 (2), S. 147. DOI: 10.1001/jama.1981.03310270027018.
24. **Böhmig, M.; Wiedenmann, B.; Rosewicz, S.** (2001): Diagnostik und Staging des Pankreaskarzinoms. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 126 (5), S. 113–116. DOI: 10.1055/s-2001-10863.
25. **Evans, J.; Chapple, A.; Salisbury, H.; Corrie, P.; Ziebland, S.** (2014): “It can't be very important because it comes and goes”--patients' accounts of intermittent symptoms preceding a pancreatic cancer diagnosis. A qualitative study. In: *BMJ open* 4 (2), e004215. DOI: 10.1136/bmjopen-2013-004215.
26. **Freelove, R.; Walling, A. D.** (2006): Pancreatic cancer. Diagnosis and management. In: *American family physician* 73 (3), S. 485–492.
27. **Zhang, Q.; Zeng, L.; Chen, Y.; Lian, G.; Qian, C.; Chen, S. et al.** (2016): Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management. In: *Gastroenterology research and practice* 2016, S. 8962321. DOI: 10.1155/2016/8962321.
28. **Vincent, A.; Herman, J.; Schulick, R.; Hruban, R.H.; Goggins, M.** (2011): Pancreatic cancer. In: *The Lancet* 378 (9791), S. 607–620. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0.
29. **Bakens, M.J.A.M.; van Gestel, Y.R.B.M.; Bongers, M.; Besselink, M.G.H.; Dejong, C.H.C.; Molenaar, I.Q. et al.** (2015): Hospital of diagnosis and likelihood of surgical treatment for pancreatic cancer. In: *The British journal of surgery* 102 (13), S. 1670–1675. DOI: 10.1002/bjs.9951.
30. **Clancy, T.E.** (2015): Surgery for Pancreatic Cancer. In: *Hematology/oncology clinics of North America* 29 (4), S. 701–716. DOI: 10.1016/j.hoc.2015.04.001.
31. **Ansari, D.; Gustafsson, A.; Andersson, R.** (2015): Update on the management of pancreatic cancer. Surgery is not enough. In: *World journal of gastroenterology* 21 (11), S. 3157–3165. DOI: 10.3748/wjg.v21.i11.3157.

32. **Hiddemann, W.; Huber, H.; Bartram, C.R.** (2004): Die Onkologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
33. **Weise, J.B.; Rudolph, P.; Heiser, A.; Kruse, M.-L.; Hedderich, J.; Cordes, C. et al.** (2008): LOXL4 is a selectively expressed candidate diagnostic antigen in head and neck cancer. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 44 (9), S. 1323–1331. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.03.026.
34. **Diercks, I.; Görögh, T.; Hoffmann, M.** (2016): Untersuchungen zur klinisch-pathologischen Bedeutung der vergleichenden immunhistochemischen Survivin und LOXL4 Expression in Oropharynxkarzinomen. In: Multimedialen Archiv- und Publikationsserver der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, http://macau.uni-kiel.de/receive/dissertation_diss_00020681
35. **Ren, C.; Yang, G.; Timme, T.L.; Wheeler, T.M.; Thompson, T.C.** (1998): Reduced lysyl oxidase messenger RNA levels in experimental and human prostate cancer. In: *Cancer research* 58 (6), S. 1285–1290.
36. **Choi, S.K.; Kim, H.S.; Jin, T.; Moon, W.K.** (2017): LOXL4 knockdown enhances tumor growth and lung metastasis through collagen-dependent extracellular matrix changes in triple-negative breast cancer. In: *Oncotarget* 8 (7), S. 11977–11989. DOI: 10.18632/oncotarget.14450.
37. **Csiszar, K.; Fong, S.F.T.; Ujfalusi, A.; Krawetz, S.A.; Salvati, E.P.; Mackenzie, J.W.; Boyd, C.D.** (2002): Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors. In: *International journal of cancer* 97 (5), S. 636–642. DOI: 10.1002/ijc.10035.
38. **Wu, G.; Guo, Z.; Chang, X.; Kim, M. S.; Nagpal, J. K.; Liu, J. et al.** (2007): LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer. In: *Cancer research* 67 (9), S. 4123–4129. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0012.

39. **Nilsson, M.; Adamo, H.; Bergh, A.; Halin Bergstrom, S.** (2016): Inhibition of Lysyl Oxidase and Lysyl Oxidase-Like Enzymes Has Tumour-Promoting and Tumour-Suppressing Roles in Experimental Prostate Cancer. In: *Scientific reports* 6, S. 19608. DOI: 10.1038/srep19608.
40. **Deng, H; Lv, L; Li, Y; Zhang, C; Meng, F; Pu, Y et al.** (2014): miR-193a-3p regulates the multi-drug resistance of bladder cancer by targeting the LOXL4 gene and the oxidative stress pathway. In: *Molecular cancer* 13, S. 234. DOI: 10.1186/1476-4598-13-234.
41. **Weise, J.; Csiszar, K.; Gottschlich, S.; Hoffmann, M.; Schmidt, A.; Weingartz, U. et al.** (2008): Vaccination strategy to target lysyl oxidase-like 4 in dendritic cell based immunotherapy for head and neck cancer. In: *Int J Oncol.* DOI: 10.3892/ijo.32.2.317.
42. **Baselga, J.** (2001): The EGFR as a target for anticancer therapy—focus on cetuximab. In: *European Journal of Cancer* 37, S. 16–22. DOI: 10.1016/S0959-8049(01)00233-7.
43. **Scola, N.; Görögh, T.** (2010): LOXL4 as a selective molecular marker in primary and metastatic head/neck carcinoma. In: *Anticancer research* 30 (11), S. 4567–4571.
44. **Kawasaki, H.; Altieri, D. C.; Lu, C. D.; Toyoda, M.; Tenjo, T.; Tanigawa, N.** (1998): Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. In: *Cancer research* 58 (22), S. 5071–5074.
45. **Sarela, A. I.** (2000): Expression of the antiapoptosis gene, Survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. In: *Gut* 46 (5), S. 645–650. DOI: 10.1136/gut.46.5.645.
46. **Geer, R. J.; Brennan, M. F.** (1993): Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. In: *The American Journal of Surgery* 165 (1), S. 68–73. DOI: 10.1016/S0002-9610(05)80406-4.

47. **Tian, M.; Liu, W.; Jin, L.; Jiang, X.; Yang, L.; Ding, Z. et al.** (2015): LOXL4 is downregulated in hepatocellular carcinoma with a favorable prognosis. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 8 (4), S. 3892–3900.
48. **Hua, Y.-J.; Wang, H.-Y.; Tang, L.-Q.; Chen, Q.-Y.; Shao, J.-Y.; Mai, H.-Q.** (2016): LOX expression in primary nasopharyngeal carcinoma. Correlation with prognostic parameters and outcome. In: *Oncotarget* 7 (7), S. 8200–8207. DOI: 10.18632/oncotarget.6996.

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Ambrosch, Direktorin der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Besonders danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. Tibor Görögh für die Überlassung des Themas und die hervorragende Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Christian Röder für die Bereitstellung der benötigten Proben, für die Einweisung in die benötigten Gerätschaften und für seine kompetente und ausführliche Beratung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Elgar Susanne Quabius für die äußerst aufmerksame Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanken.

Bei Frau Gudrun Scherer bedanke ich mich für die verlässliche Unterstützung, die sie mir im Rahmen der experimentellen Erstellung der Arbeit zukommen ließ.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren 2. Februar 1992 in Mainz

Familienstand Ledig

Staatsangehörigkeit Deutsch

Schulbildung

2011 Abitur am Albert-Einstein-Gymnasium Buchholz

Hochschulausbildung

2012 bis 2014 Medizinstudium, Universität Lettlands, Riga

2014 bis 2018 Medizinstudium, CAU Kiel

Publikation Kiel, M.; Quabius, E.S.; Röder, C.; Hoffmann, M.; Görögh, T. (2017): Lysyloxidase-4 is a selectively expressed candidate diagnostic antigen in pancreatic cancer. In: *Medical and Clinical Archives* 1 (1), S. 1-5. DOI: 10.15761/MCA.1000101.

Soziales Engagement

2017 bis 2018 Präsident Rotaract Club Kiel

Kiel, November 2017